

氏名・(本籍)	しろ 城	いし 石	とし 俊	ひこ 彦
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	733	号	
学位授与年月日	昭和56年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻			
学位論文題目	日本産野生マウスH-2抗原多型の免疫遺伝学的研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	樋渡	宏一	教授
				小西
				和彦
				教授
				竹内
				拓司
				助教
				井出
				宏之

論 文 目 次

I. 序 論

II. 材料と方法

III. 結 果

- (1) 実験用マウス系統間の免疫で作製した。抗実験用マウスH-2血清を用いた。日本産野生マウスH-2抗原の検索
- (2) BIO・MOL-H-2コンジェニック系統で実験用マウスを免疫に作製した抗-BIO・MOL・H-2血清を用いた検索
- (3) 日本産野生マウスH-2抗原の抽出と精製

IV. 議 論

V. 要 旨

謝 辞

参考文献

図の説明

図 表

論文内容要旨

I. 序 論

多細胞生物の細胞表面には、種々の抗原が発現されている。それらは、免疫応答をはじめ発生分化など様々な局面で、細胞間識別機構と関連して、重要な生物学的役割を担っていると考えられている。

マウスの細胞表面には、H-2 抗原と呼ばれる組織適合抗原があり、組織片移植の際の拒絶反応に関与している。H-2 抗原は、遺伝学的解析が容易なことから、これまで活発な研究が進められてきた。自然集団を含めたこれらの研究の結果、野生マウスに 200 以上に及ぶ対立遺伝子が存在すること、さらに、各対立遺伝子が支配する抗原タンパク質の間に、10%を越すアミノ酸置換が見られることなどが明らかになってきた。

1960 年代半ばから、種々の生物の自然集団中の遺伝的変異が、タンパク質レベルで調べられるようになり、驚く程多くの個体変異が集団中に保有されていることが知られるようになってきた。しかし、H-2 抗原の遺伝的多型は、その莫大な対立遺伝子数と各対立遺伝子間に見られるアミノ酸配列の大きな差異の二点において、他に例をみない極めて特異的な現象と考えられる。この顕著な H-2 抗原多型の生物学的意義は、未だに謎であるこの抗原の機能と共に、現在の免疫遺伝学の最も大きな問題の一つである。しかしながら、自然集団における H-2 抗原の分析は、実験用マウスを含めて、一亜種であるヨーロッパ産マウス (*M. m. domestica*) に限られていた。日本には、この亜種から遺伝的に大きくかけ離れた *M. m. molossinus* と呼ばれる別亜種が分布している。

本研究では、新しい研究方向として、従来、マウスの一亜種に限定されていた研究材料の枠を日本産野生マウスまで拡大することを試みた。H-2 抗原の遺伝的多型がヨーロッパ産以外のマウスにも広く認められるか否か、又、ヨーロッパ産マウス共通な抗原性が、亜種を越えて、日本産野生マウスにも見られるか否か等の問に答えることは、H-2 抗原の遺伝的多様性の起源の問題を解明し、同時に、その生物学的意義を考える上での手がかりを与えてくれるものと思われる。従って、実験用マウスと、彼等から大きな遺伝的距離を有する日本産野生マウスを対象として、広く H-2 抗原特異性を検索し、マウスの種全体としての H-2 抗原多型現象を把握することは、意義のある研究課題であると考えられる。

II 材料と方法

(1) 日本産野生マウス H-2 遺伝子を持つ BIO・MOL-H-2 コンジェニック系統の作出

日本産野生マウスという新しい研究素材を、さらに詳細な免疫遺伝学的研究に利用するため、H-2 遺伝子座領域以外の遺伝的背景を実験用マウスと共通にして、他の遺伝子の影響を除くことを試みた。このために、日本各地から採集した野生マウスの H-2 遺伝子を戻し交配によって、実験用マウスである BIO 系に導入し、次の 9 系統の BIO・MOL-H-2 コン

ジェニックマウスを作出した。

BIO・MOL-TeB, BIO・MOL-TeA, BIO・MOL-Ns

BIO・MOL-Om, BIO・MOL-Mis, BIO・MOL-Aj

BIO・MOL-Sg, BIO・MOL-OKb, BIO・MOL-TKB

(2) 抗血清

本研究では、大別して二種類の抗血清を用いた。一つは、実験用マウスの系統間で免疫に作製した抗実験用マウス H-2 血清であり、他の一つは、BIO・MOL-H-2 系で実験用マウスを免疫して作製した抗 BIO・MOL-H-2 血清である。いずれの抗血清も Snell (1968) の方法を用いて作製した。

(3) 細胞障害試験

実験結果の再現性を高め、手技を簡便化する目的で、新しく平板型マイクロタイトレーションプレートを考案し、このプレートを用いた微量細胞障害試験を開発した (城石, 嵯峨井, 森脇, 1980)。この方法により極めて少量のリンパ球と抗血清で細胞障害試験を行うことができた。尚、補体としては、ウサギ正常血清を用いた。

(9) H-2 抗原の抽出及び精製法

Schwartzら (1976) の方法を改良して行った。

(³H)-Leucine で標識した細胞表面抗原を NP-40 で可溶化し、10,000 G 遠沈上清を LCH-Sephavose アフィニティーカラムを通して糖タンパク質分画を集めた。さらに、*Staphylococcus aureus* cowan I (SacI) を adsorbent とした H-2 抗血清による免疫沈降反応で H-2 抗原を精製した。精製試料は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分析した。精製に用いた材料は、実験用マウスの BIO・BR 系と BIO・DR 系、BIO・MOL H-2 系として BIO・MOL-Sg 系と BIO・MOL-YK 系の計 4 系統である。

III 結 果

(1) 実験用マウス系統間の免疫で作製した抗実験用マウス H-2 血清を用いた、日本産野生マウス H-2 抗原の検索

- (i) 日本産野生マウスの H-2 抗原は、別亜種であるヨーロッパ産マウスと共通な抗原特異性を数多く持っている。
- (ii) 抗原特異性の出現頻度について、両亜種の間で明瞭な差異は認められない。
- (iii) 調べられた BIO・MOL-H-2 コンジェニック系統の H-2 抗原特異性の組み合わせは、各々の系統で全て異っている。従って、各系統は、異った H-2 ハプロタイプを持っている。
- (iv) 細胞障害試験と赤血球凝集試験により、BIO・MOL-H-2 系について、赤血球での H-2 抗原の発現が抑制されているものがあることがわかった。

(2) BIO・MOL-H-2 コンジェニック系で実験用マウス免疫に作製した抗-BIO・MOL-H-2 血清を用いた検索

(i) これらの抗血清は、Donor として用いた BIO・MOL-H-2 系統以外に、少数の BIO・MOL-H-2 系統と反応した。

(ii) 各抗血清が反応した H-2 抗原性を有するマウスは、Donor 系統の近傍の地域に特定して、みられるのではなく、地理的に偏りなく、散在している。

(iii) BIO・MOL-H-2 系統以外の 17 の実験用マウス系統、及び、別亜種である *M. m. bactrianus*, *M. m. castaneus* 等の野生マウス H-2 遺伝子を導入した BIO・コンジェニック系統について調べたところ、各抗血清は、それらの系統の幾つかと反応することがわかった。これらの抗血清の反応性について、BIO・MOL-H-2 系と別亜種である他の系統の間で、差は認められず、日本産野生マウスの H-2 抗原を共通な抗原性を持つマウスが種全体に拡がって分布していることがわかった。

(3) 日本産野生マウス H-2 抗原の抽出と精製

BIO・MOL-H-2 コンジェニックマウスの二系統を材料とした H-2 抗原精製試料を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ、BIO・MOL-Sg では分子量約 50,000 の H-2 抗原の単一ピークがみられ、一方 BIO・MOL-TKB では 45,000 の H-2 抗原のピークの他に I の抗原と考えられる二つのピークがみられた。これまで、実験用マウスで調べられてきた H-2 抗原の分子量は、約、45,000 である。今回、BIO・BR と BIOD 2 の二つの実験用マウスで分析したところ、各々 45,000 の分子量が観察された。従って、BIO・MOL-Sg 系統の H-2 抗原は、従来知られているものより、約 5,000 ダルトン大きな分子量を有することがわかった。

IV 議 論

本研究の主なねらいは、ヨーロッパ産マウスと日本産野生マウスとの遺伝的距離を基礎において、両亜種における H-2 抗原多型を比較分析し、H-2 抗原にみられる極めて大きな変異性が、マウス亜種分化のどの段階で生じ、又どの様に維持されているかを明らかにしようというものである。

従って、両亜種の間には大きな遺伝的距離が存在することが、この研究を進める上での重要な前提条件であった。この条件が充分満たされていることを示す証拠が、すでにいくつかの観点から挙げられている。1 ミトコンドリア DNA の制限酵素による Cleavage pattern. 2 染色体 C-band の分布 3 免疫グロブリンのアロタイプ 4 補体成分のアロタイプ 5 ウィルス (*Finend virms*) に対する遺伝的担抗性 6 種々の生化学指標タンパク質。これらの諸点において、両亜種の間には大きな遺伝的差異が存在することが、明らかになっている。

この事実を踏まえて、日本産野生マウスの H-2 抗原を検索した結果、ヨーロッパ産マウス

と共通な抗原特異性が、数多く見られ、類似した抗原多型が、遺伝的にかけ離れた亜種を越えて、広く存在することがわかった。又、日本産野生マウス H-2 抗原に対する抗-BIO・MOL-H-2 血清を用いても、共通抗原が、ヨーロッパ産マウスをはじめ、別亜種である *M. m. bactrianus* や *M. m. caotaneus* まで広く分布していることがわかった。さらに、それらの抗原性の地理的分布に偏りが見られず、共通抗原が、マウスの種全体に散在していることが明らかになった。

これらの結果から、次の結論が導かれる。血清学的に検出される H-2 抗原の遺伝的多型は、少なくとも、祖先型マウスがヨーロッパ産マウス (*M. m. domesticus*)、日本産野生マウス (*M. m. molossivus*)、及び他の亜種へ分岐する以前から存在し、それらは各亜種の集団の中に持ちこまれたまま、現在まで維持されている。

マウスの種全体として、H-2 抗原の遺伝的多型が長い期間維持されてきたことは、このような抗原の多様性が、マウス自然集団において、重要な生物学的意義を持っていることを示唆している。

現段階では、H-2 抗原多型の維持機構を明らかにすることはできないが、自然集団における解析によって、遺伝的多型と関連した H-2 抗原の生物学的機能を解明する糸口がつかめるものと思われる。

一方、血清学的検索と異なり、日本産野生マウス H-2 抗原の中には、BIO・MOL-Sg系で示されたように、50,000 の分子量を持つものが存在することが明らかになった。これが、他の日本産野生マウスにも普遍的にみられるかどうかを明らかにし、分子量の違いが、糖タンパク質である H-2 抗原の糖部分にあるか、タンパク質部分にあるかを明らかにすることは今後に残された重要な問題点の一つである。もし、タンパク質部分に違いがあることになれば、日本産野生マウスには、H-2 遺伝子の大きさがヨーロッパ産マウスと異なるものが存在することになる。いずれにしても、マウスの一亜種に限られていた研究対象を他の亜種にも拡大し、マウスの種全体を対象として H-2 抗原多型を分析してゆこうという試みは、意義のある研究方向であると思われる。

論文審査の結果の要旨

マウスの細胞表面には、H-2抗原と呼ばれる組織適合抗原があり、組織片移植の際の拒絶反応に関与している。すでに諸系統の実験用マウスを用いた遺伝解析によって、H-2抗原を支配する多くの遺伝子が知られている。この論文は日本産野生マウスを対象として、H-2抗原に関する遺伝的多型が存在するか否かを免疫学的に検索したものである。まづヨーロッパ原産の実験用マウス系統間の免疫で作製した抗H-2抗血清を用いて調べた結果、日本産野生マウスのH-2抗原は、別亜種であるヨーロッパ産マウスと共通の抗原特異性を数多く持っており、抗原の出現頻度も両亜種の間で明瞭な差異のないことが認められた。次に日本各地で採集した野生マウスのH-2遺伝子をもどし交配によって実験用マウスに導入し、コンジェニックマウス9系統を作り、さらに実験用マウスを免疫して作製した抗血清を用いて検索した結果、供与体の系統以外の系統とも反応すること、および、これらの抗血清と反応するマウスは供与体の近傍の地域に限られるのではなく、地理的に偏りなく散在することが明らかになった。一方実験用マウス17系統および別亜種のマウスについて調べた結果、これらが日本産野生マウスのH-2抗原と共通な抗原性を持つことも明らかになった。また、これらのコンジェニックマウス2系統を材料として、H-2抗原精製試料をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ、一つの系統(BIO・MOL-Sg)では分子量約50,000のピークがみられ、他の系統(BIO・MOL-YKB)では分子量45,000のピークが認められた。これまで実験用マウスで認められたH-2抗原の分子量は約45,000であり、BIO・MOL-Sg系のH-2抗原の分子量は従来知られているものよりも約5,000大きいことになる。以上の結果、日本産野生マウスにおいても、ヨーロッパ産マウスと共通の抗原特異性がみられ、類似した抗原の多型が遺伝的に距離のある亜種を越えて広く存在することが明らかになった。さらにそれらの抗原性の地理的分布に偏りが見られず、共通抗原がマウスの種全体に散在していることも明らかとなった。これは、H-2抗原に関する遺伝的多型は少なくとも現在の亜種が分岐する以前に存在し、各亜種の集団の中に持ちこまれたことを示すものであり、マウスの進化過程に関する新しい知見である。したがって、この論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって城石俊彦提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。